

# AMPLIFICATION AND DETECTION OF HIV-I AND/OR HIV-2

**Publication number:** JP11069987 (A)

**Publication date:** 1999-03-16

**Inventor(s):** BACKUS JOHN WESLEY; ATWOOD SUSAN MELISSA; CASEY ANN ELIZABETH; RASMUSSEN ERIC BRICE; CUMMINS THOMAS JOSEPH +

**Applicant(s):** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC +

**Classification:**

- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/566; G01N33/569; C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/566; G01N33/569; (IPC-1-7): C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/566; G01N33/569

- European: C12Q1/70B2B

**Application number:** JP19980177059 19980624

**Priority number(s):** US19970050759P 19970625

**Also published as:**

JP4339427 (B2)  
EP0887427 (A2)  
EP0887427 (A3)  
EP0887427 (B1)  
ES2256920 (T3)

more >>

**Abstract of JP 11069987 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To detect the subject virus of total subtype, by bringing a specimen having a suspicion of containing a nucleic acid of HIV 1 and/or 2 into contact with the whole kinds of nucleoside triphosphates, a thermostable DNA polymerase and a specific primer set. **SOLUTION:** A specimen having a suspicion of containing a nucleic acid of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and/or human immunodeficiency virus 2 (HIV-2) is brought into contact under conditions of amplifying HIV-1 nucleic acid and HIV-2 nucleic acid with four different nucleoside triphosphates, a thermostable DNA polymerase derived from *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermococcus* literals or the like and at least four oligonucleotides.; In the case of HIV-1 nucleic acid, a set of formula I to formula IV is used as the four oligonucleotides and in the case of HIV-2 nucleic acid, a set of formula V to formula VIII is used as the four oligonucleotides to amplify and to detect the whole subtype HIV-1 and HIV-2.

GACCAGATCTGAGCCTCGGAGCT

I

GGGTCTGACGGATCTCTAGTTACCAGACT

II

TCCGGTTTATTACADGGACAGCAGAGA

III

CTTGTAATTACTACTGCCCTTCACCTTTCCA

IV

CCGGGATAGTCAGCAACAGCAACA

V

CCCAGACGGTCAGTCGCAACA

VI

GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA

VII

CGGACTAGCAGAGATGGCAACACACA

VIII

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

**Family list**

8 application(s) for: **JP11069987 (A)**

Sorting criteria: Priority Date Inventor Applicant Ecla

**1 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **AT315667 (T)** - 2006-02-15  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+8)

**Priority Date:** 1997-06-25

**2 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **DE69833160 (T2)** - 2006-09-14  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+7)

**Priority Date:** 1997-06-25

**3 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **DK0887427 (T3)** - 2006-05-15  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+7)

**Priority Date:** 1997-06-25

**4 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **EP0887427 (A2)** - 1998-12-30  
**info:** **EP0887427 (A3)** - 2001-10-17  
**EP0887427 (B1)** - 2006-01-11

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+8)

**Priority Date:** 1997-06-25

**5 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **ES2256920 (T3)** - 2006-07-16  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+8)

**Priority Date:** 1997-06-25

**6 AMPLIFICATION AND DETECTION OF HIV-I AND/OR HIV-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY ; ATWOOD  
SUSAN MELISSA (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **JP11069987 (A)** - 1999-03-16  
**info:** **JP4339427 (B2)** - 2009-10-07

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC

**IPC:** C12N15/09; C12Q1/68; C12Q1/70; (+11)

**Priority Date:** 1997-06-25

**7 Amplification and detection of hiv-1 and/or hiv-2**

**Inventor:** BACKUS JOHN WESLEY [US] ;  
ATWOOD SUSAN MELISSA [US] (+3)

**EC:**

**Publication** **SI0887427 (T1)** - 2006-06-30  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12Q1/70

**Priority Date:** 1997-06-25

**8 Amplification and detection of HIV-1 and/or HIV 2**

**Inventor:** BACKUS JOHN W [US] ; ATWOOD  
SUSAN M [US] (+3)

**EC:** C12Q1/70B2B

**Publication** **US6001558 (A)** - 1999-12-14  
**info:**

**Applicant:** ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC  
[US]

**IPC:** C12Q1/70; C12Q1/70; (IPC1-7): C12Q1/68

**Priority Date:** 1997-06-25

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-69987

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月16日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup> C 1 2 N 15/09 C 1 2 Q 1/68 G 0 1 N 33/566 33/569		識別記号 Z N A		F I C 1 2 N 15/00 C 1 2 Q 1/68 G 0 1 N 33/566 33/569		Z N A A A H	
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 16 頁)							
(21) 出願番号 特願平10-177059				(71) 出願人 598026840 オルソークリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14626- 5101, ロチェスター, インディゴ クリーク ドライブ 100			
(22) 出願日 平成10年(1998) 6月24日				(72) 発明者 ジョン ウェスリー バッカス アメリカ合衆国, カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, ビア カパロ ロジョ 12865			
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 0 7 5 9				(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)			
(32) 優先日 1997年 6月25日							
(33) 優先権主張国 米国 (US)							
最終頁に続く							

(54) 【発明の名称】 HIV-1および/またはHIV-2の増幅と検出

(57) 【要約】

【課題】 ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 1型および/または2型からの核酸の増幅と検出のための方法および試験キットを提供する。

【解決手段】 該方法は、M群およびO群分離株を含むHIV-1の全亜型とHIV-2の全亜型を増幅させるために複数のプライマーセットを使用する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)からの核酸を増幅させる方法であって、HIV-1核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-1核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼおよび少なくとも4つのオリゴヌクレオチドと接触させることを含んで成り、前記少なくとも4つのオリゴヌクレオチドの4つのオリゴヌクレオチドが

- (a) 配列番号1, 3, 7および8のセット;
- (b) 配列番号1, 4, 7および8のセット;
- (c) 配列番号2, 3, 7および8のセット;並びに
- (d) 配列番号2, 4, 7および8のセット

から選ばれる方法。

【請求項2】 前記少なくとも4つのオリゴヌクレオチドの5つのオリゴヌクレオチドが

- (a) 配列番号1, 2, 3, 7および8のセット;
- (b) 配列番号1, 2, 4, 7および8のセット;
- (c) 配列番号2, 3, 4, 7および8のセット;
- (d) 配列番号1, 3, 4, 7および8のセット;並びに
- (e) 配列番号1, 2, 3, 4, 7および8のセット

から選ばれ、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記5つのオリゴヌクレオチドが配列番号2, 3, 4, 7および8である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記少なくとも4つのオリゴヌクレオチドの6つのオリゴヌクレオチドが配列番号1, 2, 3, 4, 7および8である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記耐熱性DNAポリメラーゼが、テルムス・アクアティカスのポリメラーゼ、テルムス・テルモフィラスのポリメラーゼおよびテルモコッカス・リトラリスのポリメラーゼから選ばれ、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 HIV-1核酸を増幅させて検出する方法であって、

- (i) HIV-1核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-1核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼおよび少なくとも4つのオリゴヌクレオチドと接触させることを含んで成り、前記少なくとも4つのオリゴヌクレオチドの4つのオリゴヌクレオチドが
- (a) 配列番号1, 3, 7および8のセット;
- (b) 配列番号1, 4, 7および8のセット;
- (c) 配列番号2, 3, 7および8のセット;並びに
- (d) 配列番号2, 4, 7および8のセット

から選ばれ;

(ii) 前記増幅したHIV-1核酸を変性させて一本鎖核酸にし;そして

(iii) 前記増幅したHIV-1核酸の存否を検出することを含んで成る方法。

【請求項7】 前記検出が、

- (a) 配列番号5および9のセット;
- (b) 配列番号5および10のセット;
- (c) 配列番号6および9のセット;並びに
- (d) 配列番号6および10のセット

から選ばれた少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプローブを使って行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記検出が配列番号5, 6, 9および10に相当する4つのオリゴヌクレオチドプローブを使って行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記検出が酵素標識されているかまたは酵素標識することができ、プローブを使って行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項10】 HIV-1核酸の増幅に有用な診断キットであって、

- (i) 配列番号1, 2, 3, 4, 7および8に相当するオリゴヌクレオチド;並びに(ii) 耐熱性DNAポリメラーゼを含んで成る診断キット。

【請求項11】 配列番号5, 6, 9および10に相当するオリゴヌクレオチドを更に含んで成る、請求項10に記載の診断キット。

【請求項12】 ヒト免疫不全ウイルス2型(HIV-2)の核酸を増幅させる方法であって、HIV-2核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-2核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼおよび少なくとも4つのオリゴヌクレオチドと接触させることを含んで成り、前記少なくとも4つのオリゴヌクレオチドの4つのオリゴヌクレオチドが

- (a) 配列番号11, 12, 14および16のセット;
- (b) 配列番号11, 12, 15および16のセット;
- (c) 配列番号11, 12, 18および20のセット;
- (d) 配列番号11, 12, 19および20のセット;
- (e) 配列番号14, 16, 18および20のセット;
- (f) 配列番号14, 16, 19および20のセット;
- (g) 配列番号15, 16, 18および20のセット;並びに
- (h) 配列番号15, 16, 19および20のセット

から選ばれる方法。

【請求項13】 次のオリゴヌクレオチド:

GACCAGATCTGAGCTGGGAGCT (配列番号1)  
CTGCTTAAGCTCAATAAAGCTTGCCCTTGA (配列番号2)  
GGGTCTAGGAGTCTCTAGTACACAGAT (配列番号3)  
TGTTCGGGGCCACTGCTAGAGA (配列番号4)  
CACAGACGGGCACACACTACT (配列番号5)  
GACCAGATGGGCACACACTGCT (配列番号6)  
TGGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGA (配列番号7)  
CTGTATTACTACTGCGCCCTTCAAGCTTCCA (配列番号8)  
AGCTTGTGCTGCTCTTCCAAATGGG (配列番号9)  
AGTTGTGGCGGTCTTCCAAATGGG (配列番号10)  
CGGGATAGTGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号11)

CCGAGCGGTCAAGCTGCGCAACA (配列番号12)  
 TGGAGCTGGTCAAGACACACAGAA (配列番号13)  
 GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA (配列番号14)  
 GAGCCCTGGAGGTTCTCTCCA (配列番号15)  
 GCGACTAGGAGAGATGGGAACACACA (配列番号16)  
 CCAAGCTTGCTTGCTTAAGACCTC (配列番号17)  
 TAGACACAGGGGCTAGAGACTCAATAGT (配列番号18)  
 CACAGGGGCTGACGACTCAATAGTAGCA (配列番号19)  
 GCCAAAATGTGATGTGGGTATCTCTGTCTTA (配列番号20)  
 CCAAAAATAGTAGGGGGAATAGGGGATTC (配列番号21)  
 CACCCCAAAAATAGTAGGTGGATAGAGGG (配列番号22)

のうちの1つまたは複数を含んで成る組成物。  
 【請求項14】 HIV-1核酸とHIV-2核酸を同時増幅させる方法であって、HIV-1核酸またはHIV-2核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-1核酸またはHIV-2核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼ、配列番号7および8に相当するオリゴヌクレオチド、配列番号1, 2, 3および4から選ばれた少なくとも1つのプライマーペア、並びに配列番号11, 12, 14, 15, 16, 18, 19および20から選ばれた少なくとも1つのプライマーペアと接触させることを含んで成る方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の増幅と検出のための方法および試験キットに関する。より詳しくは、本発明は、複数のプライマーセットを使用してHIV-1の全ての型型(M群およびO群分離株を含む)とHIV-2の全ての型型を増幅させるPCR法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】後天性免疫不全症候群(エイズ; AIDS)およびその原因物質であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)の理解は日々進歩している。ヒト免疫不全ウイルスには2つの群、HIV-1とHIV-2が同定されている。HIV-1とHIV-2は遺伝学的に関連しているが、それでも別のものである。HIV-1とHIV-2は共に、異なる分離株間で相当な遺伝的変異性を示す。実際、HIV-1には10の型型(型型A-Iを含むM群と、型型Oを含むO群)が同定されている。様々なHIV-1分離株とHIV-2分離株の発表されたヌクレオチド配列からHIV-1とHIV-2の共通配列が生成されたけれども、HIV-1の全分離株間またはHIV-2の全分離株間に実在する絶対的配列保存領域を見つけることはできない。HIV分離株間に見られる遺伝的変異性に加えて、HIVの多数のヌクレオチド領域は、それらがHIV-1ファミリーとHIV-2ファミリーの中にあるのと同じくらい高度にHIVと無関連ウイルスとの間で保存される。これらの事実は一緒にな

って、無関連ウイルスを誤って検出することなくHIV-1の全M群およびO群型型並びにHIV-2の全型型を効率的に検出するようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーおよびプローブをデザインすることを非常に難しくする。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】全ての既知HIV-1およびHIV-2型型を検出する増幅方法を開発しようとする者が直面する課題の1つは、単一設定の増幅条件(例えば塩濃度、温度および増幅時間)で一緒に使った時に適切に機能するオリゴヌクレオチドプライマーセットの開発である。プライマー-プライマー相互作用およびプライマー-プローブ相互作用の点から適合するプライマーおよび検出プローブを同定することは、更に大きな課題である。従って、HIV-1および/またはHIV-2の増幅と検出の場合、理想条件より低い条件下で高度に分化した型型または分離株を検出する可能性を最大にする段階が今まだ必要とされている。

##### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決し、そして高度に分化したHIV-1および/またはHIV-2分離株を増幅させて検出する必要手段を提供する。よって、本発明の目的はあらゆる既知のHIV-1型型および/またはHIV-2型型の検出のための方法および試験キットを提供することである。本発明の他の目的や利点は本発明の詳細な説明から明白であらう。

##### 【0005】

【発明の実施の形態】一態様では、本発明はHIV-1核酸を増幅させる方法に関する。この方法はHIV-1核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-1核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼおよび少なくとも4つのオリゴヌクレオチドと接触させることを含んで成る。前記4つのオリゴヌクレオチドは  
 (a) 配列番号1, 3, 7および8のセット;  
 (b) 配列番号1, 4, 7および8のセット;  
 (c) 配列番号2, 3, 7および8のセット; 並びに  
 (d) 配列番号2, 4, 7および8のセットから選ばれる。

【0006】別の態様では、本発明はHIV-2核酸を増幅させる方法であって、HIV-2核酸を含む疑いのある試料を、前記HIV-2核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼおよび少なくとも4つのオリゴヌクレオチドと接触させることを含んで成る方法に関する。前記4つのオリゴヌクレオチドは

- (a) 配列番号11, 12, 14および16のセット;
- (b) 配列番号11, 12, 15および16のセット;
- (c) 配列番号11, 12, 18および20のセット;
- (d) 配列番号11, 12, 19および20のセット;

- (e) 配列番号14, 16, 18および20のセット;  
 (f) 配列番号14, 16, 19および20のセット;  
 (g) 配列番号15, 16, 18および20のセット;並びに  
 (h) 配列番号15, 16, 19および20のセット  
 から選ばれる。

【0007】更に別の態様では、本発明はHIV-1標的核酸とHIV-2標的核酸を同時増幅させる方法に関する。いずれかのHIV核酸を含む試料を、HIV-1標的核酸またはHIV-2標的核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸、耐熱性DNAポリメラーゼ、配列番号1, 2, 3, 4, 7および8から選ばれた少なくとも1つのプライマーペア、並びに配列番号11, 12, 14, 15, 16, 18, 19および20から選ばれた少なくとも1つのプライマーペア、と接触させることを含む。成る。

【0008】HIV-1およびHIV-2の全型型を高感度に且つ特異的に検出することができるHIV-1およびHIV-2の同時増幅方法の開発は、幾つかの理由により大きな課題である。(1) 個々の分離株間の核酸配列レベルでの多様性;(2) 副生成物の生成はアッセイ感度と多分特異性も低下させるだろうから、少なくとも8~10プライマー間のプライマー-プライマー相互作用を最小にする必要があること;(3) 増幅生成物を特異的に検出する必要があること(理論的には増幅プライマーに内在するアロブとのオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションにより達成させるだろう);および(4) 調整した患者被検物中の阻害剤の存在と試料調製からの標的核酸の非効率的回収の両方を抑制する必要があること。本出願人はそれらの障害を克服し、HIV-1およびHIV-2核酸の増幅および/または検出に関する本発明に到達した。

【0009】本発明において、互いに適合するので組み合わせてHIV-1およびHIV-2の配列決定された全分離株を検出することのできる複合同時増幅アッセイの構成要素となることができ、HIV-1およびHIV-2のためのプライマーセットを開発した。本発明の方法を使えば、当業者は高い信頼性でHIV-1とHIV-2の両標的核酸を高感度に且つ特異的に増幅および検出することができる。この増幅と検出は、試料調製、増幅および/または検出に問題があると偽陰性結果を示す内部陽性対照(IPC)の存在下で且つ多重化方式で実施することができる。

【0010】本発明は、HIV-1および/またはHIV-2核酸を増幅させる方法に関する。様々な組み合わせで用いると、HIV-1および/またはHIV-2の全ての既知分離株からの標的核酸を高感度に且つ特異的に増幅せしめるオリゴヌクレオチドプライマーセットが同定された。本発明に従ってHIV-1標的核酸を増幅せしめるためには、次のオリゴヌクレオチドからプライマーセットが選ばれる:

- 【0011】HIV-1  
 LTR領域プライマー:  
 GACCAGATCTGAGCTGGAGCT (配列番号1)  
 CTGCTTANGCTCAATAAGCTTGCTTGA (配列番号2)  
 GGGCTGAGGGATCTCTAGTTACAGAGT (配列番号3)  
 TGTTCGGGCGCACTGCTAGAGA (配列番号4)  
 【0012】POL領域プライマー:  
 TCGGGTTTATTACAGGCGCAGAGAGA (配列番号7)  
 CTGTGTTACTACTGCCCTTCACTCTTCCA (配列番号8)  
 【0013】本発明の方法では、HIV核酸を含む試料のある生物学的試料を、少なくとも4つのオリゴヌクレオチドを含んで成るプライマーセットと接触させることにより、HIV-1標的核酸を増幅させる。本発明での使用に相当するプライマーセットとしては、  
 (a) 配列番号1, 3, 7および8のセット;  
 (b) 配列番号1, 4, 7および8のセット;  
 (c) 配列番号2, 3, 7および8のセット;並びに  
 (d) 配列番号2, 4, 7および8のセット  
 が挙げられるが、それらに限定されない。  
 【0014】それらのプライマーセットの4つのオリゴヌクレオチドは、単独または別のHIV-1もしくはHIV-2プライマーと組み合わせ使用してもよい。例えば、配列番号2のオリゴヌクレオチドを上記プライマーセット(a)または(b)と共に使用することができる。好ましいプライマーセットは、  
 (a) 配列番号1, 2, 3, 7および8のセット;  
 (b) 配列番号1, 2, 4, 7および8のセット;  
 (c) 配列番号2, 3, 4, 7および8のセット;  
 (d) 配列番号1, 3, 4, 7および8のセット;並びに  
 (e) 配列番号1, 2, 3, 4, 7および8のセット  
 である。  
 【0015】より好ましいのは、配列番号2, 3, 4, 7および8に相当するオリゴヌクレオチドを含むプライマーセットである。それらのプライマーセットのうちのいずれも、M群およびO群を含む全ての既知HIV-1型型からの核酸を増幅させるのに用いることができる。  
 【0016】プライマーセットに加えて、生物学的試料は、該試料中に存在する任意のHIV-1核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸および耐熱性DNAポリメラーゼのようなPCR試薬とも接触せしめる。  
 【0017】本発明に従ってHIV-2標的核酸を増幅せしめるためには、次のオリゴヌクレオチドからプライマーセットが選ばれる:  
 HIV-2  
 ENV領域プライマー:  
 CGGGATAGTGCAGCAACAGCAACA (配列番号11)  
 CCCGACGGTCAGTGCACCA (配列番号12)  
 【0018】LTR領域プライマー:  
 GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA (配列番号14)

GAGCCTGGGAGTTCTCTCCA (配列番号15)

GGAGCTAGGAGAGATGGGACACACA (配列番号16)

【0019】POL領域プライマー:

TAGACACAGGGGCTGAGACTCAATAGT (配列番号18)

CACAGGGGCTGACGACCTCAATAGTGA (配列番号19)

GCCAAAATGTTGATTGGGATCTCTCTGATTA (配列番号20)

【0020】本発明の方法では、HIV-2核酸を含む疑いのある生物学的試料を、少なくとも4つのオリゴヌクレオチドを含んで成るプライマーセットと接触させることにより、HIV-2標的核酸を増幅させる。本発明での使用に相当するプライマーセットとしては、

(a) 配列番号11, 12, 14および16のセット;

(b) 配列番号11, 12, 15および16のセット;

(c) 配列番号11, 12, 18および20のセット;

(d) 配列番号11, 12, 19および20のセット;

(e) 配列番号14, 16, 18および20のセット;

(f) 配列番号14, 16, 19および20のセット;

(g) 配列番号15, 16, 18および20のセット;並びに

(h) 配列番号15, 16, 19および20のセット

が挙げられるが、それらに限定されない。

【0021】好ましいのは、配列番号11, 12, 14および16に相当するオリゴヌクレオチドを含むプライマーセットである。それらのプライマーセットのいずれも、全ての既知HIV-2亜型からの核酸を増幅させるために用いることができる。

【0022】プライマーセットに加えて、生物学的試料は、該試料中に存在する任意のHIV-2核酸が増幅されるような条件下で、4つの異なるヌクレオシド三リン酸および耐熱性DNAポリメラーゼのようなPCR試薬とも接触させられる。

【0023】HIV-1とHIV-2の両方を増幅せしめるためには、生物学的試料を本発明のHIV-1プライマーセットと一緒に本発明のHIV-2プライマーセットと接触させる。好ましくは、生物学的試料を配列番号2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14および16に相当するオリゴヌクレオチドと接触させる。そのようなプライマーセットの使用により、試料中に存在するどんな既知HIV-1および/またはHIV-2亜型の標的核酸でも増幅させることができる。

【0024】本発明の方法は、ある場合には、配列番号2, 3および4を含むプライマーセットのように、共通プロンプ領域と重なる標的核酸配列を増幅させるために、3つ以上のプライマーを使用する。これは増幅システムの系統 (strain) 感受性と強固さを最大にする。この新規特徴は、アッセイ方法の系統感受性を増大させ、且つ増幅システムの感受性と強固さを増大させるという結果において各々が別々の利益、例えば大きな増幅効率および分離検出の高い配列相同性を与えるようなプライマーの組合せを考慮に入れる。

【0025】本発明の1または複数のプライマーセット

を使ってHIV-1および/またはHIV-2標的が増幅されれば、増幅させたHIV-1および/またはHIV-2標的核酸に特異的な1または複数のオリゴヌクレオチドプロンプを使って、増幅させたHIV標的の存在を検出することができる。当業者は、使用したプライマーセットに応じて、増幅させたHIV-1および/またはHIV-2標的核酸を検出するのに適するオリゴヌクレオチドプロンプを容易に同定することができる。本発明での使用に相当するオリゴヌクレオチドプロンプとしては、非限定的に、次のオリゴヌクレオチドが挙げられる:

【0026】HIV-1

LTR領域プロンプ:

CACACAGCGGGCACACACTACT (配列番号5)

GAACAGATGGGCACACACTGCT (配列番号6)

【0027】POL領域プロンプ:

AGCTTTGCTGCTCTTCCAAATGGG (配列番号9)

AGTTGTGCGCGTCTCTTCCAAATGGG (配列番号10)

【0028】HIV-2

ENV領域プロンプ:

TGGAGCTGGTCAAGAGACAACAAGAA (配列番号13)

LTR領域プロンプ:

CCAGCTTGTCTGCTTAAGAACCTC (配列番号17)

【0029】POL領域プロンプ:

CCAAAATAGTAGGGGGATAGGGGGATC (配列番号21)

CACCCCAAAATAGTGGTGGATAGGAGG (配列番号22)

【0030】好ましくは、増幅させたHIV-1およびHIV-2標的は、配列番号5, 6, 9および10に相当するプロンプと、次の組合せ: 配列番号13と17、または13, 21および22、または17, 21および22のいずれかとを使って検出する。

【0031】本発明は、プライマー領域に比較して低度の配列保存を有する領域について探索する時は、全ての既知分離株を検出するために複数の重複したプロンプを使用する。これにより、一般的には増幅生成物の配列特異性の検出に必要なような高度に保存され且つ高度に特異的なプロンプ領域によって隔たれていない領域において増幅プライマーをデザインすることが可能である。ある状況では、例えばHIV-1の場合、全ての既知分離株を高感度で検出するために複数のプロンプが必要である。

【0032】PCRを使った核酸の増幅と検出のための一般原理および条件は非常に良く知られており、その詳細は米国特許第4,683,195号 (Mullis他)、同第4,683,202号 (Mullis) および同第4,955,188号 (Mullis他) をはじめとする多数の文献中に提供されている。よって、上記技術の教示とその中に与えられる特別の教示を参照すれば、当業者はHIV-1およびHIV-2の既知の全亜型を検出するために本発明を実施するのは何ら難しくないはずである。



【0033】「生物学的試料」という語は、検出することのできる核酸を含有する細胞もしくはウイルス物質、毛髪、体液または細胞成分を限定的でなく包含する。

「オリゴヌクレオチド」という語は、1または複数のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドから成る分子、例えばプライマー、プローブ、および検出しようとする核酸断片のことを言う。

【0034】「プライマー」という語は、天然に存在するにせよ合成的に製造されるにせよ、核酸鎖（すなわち鋳型）に相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘導されるような条件（そのような条件には、別のPCR試薬の存在、並びに適当な温度およびpHが含まれる）下に置いた時に合成の開始点として働くことができるオリゴヌクレオチドのことである。

【0035】プライマーは、最大の増幅効率のために好ましくは一本鎖であるが、所望であれば二本鎖領域を含むことができる。それはDNAポリメラーゼの存在下で伸長生成物の合成を開始させるのに十分な程長くなければならない。各プライマーの正確なサイズは、意図する使用目的、プライマーの濃度および配列、標的配列の複雑さ、反応温度、並びにプライマーの起源に依存して異なるだろう。本発明で使用するプライマーは通常12~60ヌクレオチドであり、好ましくは16~40ヌクレオチドを有するだろう。より好ましくは、各プライマーは18~35ヌクレオチドを有する。

【0036】本発明に有用なプライマーは、既知の技術と装置、例えばABI DNA 合成装置 (Applied Biosystems から入手可能) またはBiosearch 8600シリーズもしくは8800シリーズ合成装置 (Milligen-Biosearch, Inc. から入手可能) を使って調製することができる。この装置を使う手順は周知であり、例えば米国特許第4,965,188号明細書 (Gelfand 他) に記載されている。生物学的源から単離された天然に存在するプライマーも有用であるかもしれない (例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物)。一般に少なくとも2つのプライマーのセットが各々の標的核酸に使われる。よって、複数の標的核酸を同時に増幅させるためにプライマーの複数セットを用いることができる。

【0037】本明細書で用いる時、「プローブ」とは標的核酸の核酸配列に実質的に相補的であり且つ増幅された標的核酸の検出または捕捉に用いられるオリゴヌクレオチドである。

【0038】本発明では、配列特異的プライマーおよびプローブが提供される。例えば、5'末端が3'末端のいずれかへのヌクレオチドの付加により (前記ヌクレオチドは標的配列に相補的であるかまたは非相補的である)、追加の配列特異的プライマーおよびプローブを調製できることは当業者に明白であろう。そのような組成物は本発明の範囲内である。

【0039】本発明において使われるプライマーおよび

／またはプローブは、所望により標識することができ、当該技術分野で既知の方法を使って、プライマーおよび／またはプローブを特異的結合リガンド (例えばビオチン)、酵素 (例えばグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウリカーゼ、およびアルカホスファターゼ)、放射性同位体、高電子密度試薬、色素原、蛍光助剤、熾光成分またはフェリンで標識することができ、好ましくは標識は特異的結合リガンドである。より好ましくは標識はビオチンもしくはその誘導体、ストレプトアビジンもしくはその誘導体、またはハプテンである。

【0040】「PCR試薬」とは、PCRに不可欠であると考えられる試薬のいずれか、すなわち、各標的核酸のためのプライマーセット、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ補因子、および1または複数のデオキシリボヌクレオシド-5'-三リン酸 (dNTP's) のことである。PCRに使われる他の任意の試薬および材料については後述する。これらの試薬は個別に、試験キットの一部分として、または試験装置の試薬室の中に、提供することができる。

【0041】DNAポリメラーゼは、プライマーと鋳型の複合体においてプライマーの3'-ヒドロキシ末端にデオキシヌクレオシド-リン酸分子を付加する酵素であるが、この付加は鋳型依存方式である。一般に、伸長生成物の合成は、新しく合成された鎖の5'から3'方向において、合成が終結するまで進行する。有用なDNAポリメラーゼとしては、例えば、E. コリDNAポリメラーゼI、T4 DNAポリメラーゼ、クワンウポリメラーゼ、逆転写酵素、および当業界で既知の他のものが挙げられる。好ましくは、DNAポリメラーゼはそれが熱に安定であることを意味する耐熱性であり、そして高い温度で、特にDNA鎖のプライミングおよび伸長に使われる高温において優先的に活性である。より詳しくは、耐熱性DNAポリメラーゼは、本明細書中に記載のポリメラーゼ連鎖反応に用いられる高温において実質的に不活性でない、そのような温度は多数の反応条件、例えばpH、ヌクレオチド組成、プライマーの長さ、塩濃度および当業界で既知の他の条件によって異なるだろう。

【0042】多数の耐熱性DNAポリメラーゼが技術の現状において報告されており、それらとしては、米国特許第4,965,188号 (Gelfand 他) および同第4,889,818号 (Gelfand 他) 明細書中に詳述されたものが挙げられる。特に有用なポリメラーゼは様々なテラムス菌種、例えばテラムス・アクアティクス (Thermus aquaticus)、テラムス・テルモフィラス (Thermus thermophilus)、テラムス・フィリフォルミス (Thermus filiformis) およびテラムス・フラブス (Thermus flavus) から得られるものである。他の有用な耐熱性ポリメラーゼは、テルモコッカス・リテラリス (Thermococcus litor)

alis)、ピロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)、テルモトガ種(*Thermotoga* sp.)およびMO-A-89/06691(1989年7月27日公開)に記載のものをはじめとする様々な生物源から得られる。幾つかの有用な耐熱性ポリメラーゼが市販されており、例えばPerkin ElmerからAmpliTag(商標)、TthおよびUltima(商標)、StratageneからPfu、並びにNew England Biolabs からVentおよびDeep-Vent が市販されている。生物体から天然ポリメラーゼを単離する技術、および組換え技術を用いて遺伝子操作された酵素を生産する技術も多数知られている。

【0043】DNAポリメラーゼ補因子とは、酵素の活性がそれに依存する非タンパク質化合物のことである。よって、補因子が存在しなければ酵素は触媒的に不活性である。多数の物質が既知の補因子であり、例えばその非限定例として、マンガンおよびマグネシウムの塩、例えば塩化物、硫酸塩、酢酸塩および脂肪酸塩が挙げられる。塩化マグネシウムおよび硫酸マグネシウムが好ましい。

【0044】PCRに更に必要であるのは、2以上のデオキシリボヌクレオシド-5'-トリリン酸、例えばdATP, dCTP, dGTP, dTTPおよびdUTPのうちの2以上である。好ましくは4種の一般的な三リン酸(dATP, dCTP, dGTPおよびdUTP)が一揃い使用される。

【0045】本明細書中に記載のPCR試薬は、標的核酸の増幅を提供するのに適当な濃度で供給されてPCRに使用される。増幅に必要なプライマー、DNAポリメラーゼ、補因子およびデオキシリボヌクレオシド-5'-トリリン酸の最小量並びに各々の最適範囲は当業界で周知である。DNAポリメラーゼの最小量は通常少なくとも約0.5単位/100  $\mu$ L 溶液であり、約2~約25単位/100  $\mu$ L 溶液が好ましく、約7~約20単位/100  $\mu$ L 溶液がより好ましい。与えられた増幅システムには他の量が有用なことがある。「1単位」は、本明細書中では74°Cで30分間の間に伸長核酸鎖の中に10ナノモルの全ヌクレオチド(dNTPs)を取り込むのに必要とされる酵素活性の量として定義される。増幅に用いる各プライマーの最小量は少なくとも約0.075 マイクロモル濃度であり、約0.1~約2マイクロモル濃度が好ましいが、他の量は当業界で公知である。補因子は通常約2~約15ミリモル濃度の量で存在する。各dNTPの量は通常約0.25~約3.5ミリモル濃度である。

【0046】PCR試薬は、任意の適当な緩衝剤(多数が当業界で既知である)を使って、約7~約9の範囲内のpHを有する緩衝液溶液中、個別にもしくは種々に組み合わせまたは全部一緒に供給することができる。

【0047】PCRにおいて使用できる他の試薬としては、例えば、耐熱性DNAポリメラーゼに特異的な抗体が挙げられる。抗体は増幅前に前記ポリメラーゼを抑制するために使用することができる。本発明に有用な抗体

は、耐熱性DNAポリメラーゼに特異的であり、約50°Cより低い温度でDNAポリメラーゼの酵素活性を抑制し、そして高い温度で失活する抗体である。有用な抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および抗体断片が挙げられる。好ましくは抗体はモノクローナルである。本発明において有用な抗体は、既知の方法、例えばHarlow他、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1988)に記載された方法を使って調製することができる。

【0048】代表的なモノクローナル抗体は米国特許第5,338,671号明細書(Scalice 他)に記載されている。常用の手法として、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(Rockville, MD)に寄託されたハイブリドーマ細胞系HB 11126または11127のいずれかを含む出発材料を使って、当業者は2つのモノクローナル抗体を容易に得ることができる。モノクローナル抗体は、DNAポリメラーゼに対してモル比約5:1~約500:1の量で存在する。

【0049】増幅された核酸は多数の既知の方法、例えば米国特許第4,965,188号明細書(Gelfand 他)に記載の方法で検出することができる。例えば、増幅された核酸はサザンブロット法、ドットブロット技術、または標識アプローブを用いる非同位体オリゴヌクレオチド捕捉検出技術を使って検出することができる。あるいは、適当に標識されたプライマーを使って増幅を行い、その標識の検出手順および検出装置を使って、増幅されたプライマー伸長生成物を検出することができる。

【0050】好ましい態様では、増幅された標的核酸は、検出用に標識されており且つ増幅された標的と直接的または間接的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドアプローブを使って検出される。該アプローブは可溶性であって且つ固体支持体に取り付けられてもよい。別の好ましい態様では、標的核酸を増幅させるのに使われるプライマーのうちの1つまたは複数が、例えば特異的結合成分によって標識される。標識プライマーが中に取り込まれている生じたプライマー伸長生成物、アプローブを使って捕捉することができる。該アプローブにハイブリダイズした増幅標的の検出は、当業界で周知である適当な検出装置および手順を使って標識アプローブの存在または増幅された標識付標的の存在を検出することにより行うことができる。標識によっても、検出装置を使わずに目で見ることもできるものもある。

【0051】より好ましい態様では、標的核酸を増幅させるのに用いるプライマーの1つまたは複数がビオチンによって標識され、増幅されたビオチン化標的核酸が固体支持体に取り付けられたアプローブにハイブリダイズせしめられる。次いで、それらを酸化剤(例えば過酸化水素)および適当な色素形成性組成物の存在下でストربتアビジン-ペルオキシダーゼ接合体と接触させることにより、結合した標識が検出される。例えば、有用な色

素形成試薬として、テトラメチルベンジジンおよびその誘導体、並びにロイコ色素、例えば米国特許第4,089,747号明細書(Bruschi)に記載のトリアリールイミダゾールロイコ色素が挙げられる。

【0052】本明細書中で時間に関して用いる時、

「約」という語は時間限界の $\pm 10\%$ を表し、そして温度に関して用いる時、「約」という語は $\pm 5^\circ\text{C}$ を表す。下記の実施例は本発明の幾つかの態様を例示するために与えられるのであって、本発明を限定するものであると解釈してはならない。

【0053】

【実施例】

材料と方法：テルムス・アクアティクス(Thermus aquaticus)からの組換えDNAポリメラーゼは既知の手順、例えば欧州特許公開EP-A-0 482 714に記載されたものを使って調製し、これは約250,000 単位/mgタンパク質の活性を有した。

【0054】下記の実施例で使用するプライマーおよびプローブは、既知の出発材料と手順を用いて、Applied Biosystems Model 380B、標準ホスホロアミダイト化学を用いる3'末端DNA合成装置、およびABI 11μモルスケール・ファーストサイクルプロトコルを使って調製した。ヌクレオシド-3'-ホスホロアミダイトおよびヌクレオシド誘導体細胞調製ガラス支持体はApplied Biosystemsから入手した。プライマーは上記に示した配列を有した。米国特許第4,962,029号明細書に記載の2つのテトラエチレングリコールスベアサーに続いて1つの市販のデュボン社製ビオチンホスホロアミダイトにより、それらの5'末端を機能性にした。米国特許第4,914,210号明細書に記載の2つのテトラエチレングリコールスベアサーに続いて1つのアミノジオール連結基によりプローブの3'末端を機能性にした。全ての精製は核酸精製カラムに続いて逆相HPLC技術を使って実施した。デオキシリボヌクレオチド(dNTPs)はSigma Chemical Co.から入手した。

【0055】幾つかの実験では、ホスホロチオエート含有プライマーを使用した。3'-ヒドロキシル基に関して末位と末位から二番目にホスホロチオエート結合を有するホスホロチオエート含有プライマーは、米国特許第5,003,087号明細書および技術公報添付カタログNo. 40-4036-xx, Glen Research, Sterling, Virginia 中にも記載された方法に従って4'-ヒドロキシル基により調製した。

【0056】ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体溶液は、リン酸緩衝食塩溶液(24 mM リン酸ナトリウムおよび75 mM 塩化ナトリウム)中に市販の(Sigma Chemical Co.)ストレプトアビジンと西洋ワサビペルオキシダーゼの接合体、カゼイン(0.5%)およびメルチオレート(0.5%)を含んで成る溶液を使用した。接合体安定剤として10 mM の4'-ヒドロキシセアト

ニリドを使用した。

【0057】内部陽性対照(IPC)標的は次のようにして調製した。ホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成により一本鎖合成標的としてIPC配列を調製した。次いでそれを5'制限部位を含むオリゴヌクレオチドプライマーを使って増幅させ、pBluescript II KS(-)プラスミドベクター中に指向性クローニングした。プラスミドを含むE. コリの大規模培養物を以前に記載された通りにアンピシリン選択条件下で増殖させた(Sambrook他, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 1989)。続いて販売業者からの適当な試薬を使ってそして販売業者の手順に従って、プラスミドDNAをQiagenカラム上で精製した。得られた精製プラスミドをTE緩衝液(10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH8.0)中に再懸濁し、濃度を分光光度測定した(Sambrook他, 1989)。続いてプラスミドを制限酵素ScaIで消化して、完全な標的配列を維持したままでプラスミドを直鎖状にした。全ての標的の系列希釈は、10ng/μlの音波処理済の子牛胸腺DNA(Sigma)を含むTE緩衝液において行った。

【0058】ロイコ色素分散液は、アガロース(0.5%)、4,5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)イミダゾールロイコ色素(250 μMモル濃度)、ジエチレントリアミン五酢酸(100 μMモル濃度)、3'-クロロ-4'-ヒドロキシセアトアニリド(5ミリモル濃度)、ポリビニルピロリドン(112 ミリモル濃度)、塩基性リン酸ナトリウム-水和物(10ミリモル濃度)および過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (8.82ミリモル濃度)を含んだ。

【0059】洗浄溶液(pH 7.4)は、塩基性リン酸ナトリウム-水和物緩衝剤(25ミリモル濃度)中に塩化ナトリウム(373 ミリモル濃度)、(エチレンジニトロ)四酢酸ナトリウム塩(2.5 ミリモル濃度)、デシル硫酸ナトリウム(38ミリモル濃度)およびエチルセリチオサリチル酸ナトリウム塩(25マイクロモル濃度)を含んだ。

【0060】ポリメラーゼ連鎖反応混合物(75 μL)は、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤(10~18ミリモル濃度、pH 8)、EDTA(0~0.75ミリモル濃度)、塩化カリウム(50ミリモル濃度)、塩化マグネシウム(4ミリモル濃度)、dATP, dCTP, dGTPおよびdTTP(各0.3 mM)、記載のプライマー(別記しないかぎり各0.4 マイクロモル濃度)、I型ゼラチン(100 ng/ml)、Taq ポリメラーゼ(16単位/100 μL)およびグリセロール(9.5%)を含有した。50倍モル過剰(ポリメラーゼに対して)のTP1-12.2と5倍過剰のTP4-9.2を使用した。

【0061】捕捉試薬を製作するために、常用の乳化重合技術を使って、ポリ(スチレン-コ-3-(p-ビニルベンジルチオ)プロピオン酸)(重量比95:5~98:

2、平均直径 $1\mu\text{m}$ から調製したポリマー粒子(平均直径 $1\mu\text{m}$ )にプローブを共有結合で取り付けた。前記粒子の中懸濁液を2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝剤(0.1モル濃度、pH 6)で洗浄し、次いで固形分約10%になるように懸濁した。緩衝剤(0.1モル濃度)中に固形分3.33%に希釈された洗浄済粒子の試料(3.3 ml)を、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジミド塩酸塩(84mg/ml水、2.1 ml)およびプローブ(44.44 OD/mlナノ純水、983  $\mu\text{L}$ )と混合した。生じた懸濁液を断続的に混合しながら湯浴中50°Cで約2時間加熱した後、遠心分離した。(エチレンジトリロ)四酢酸二ナトリウム塩(0.0001モル濃度)を含むトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤(0.01モル濃度、pH 8)で粒子を3回洗浄し、そして固形分4%になるように中に再懸濁した。

【0062】緩衝剤で固形分0.25%に希釈したらずに、捕捉試薬(1~2  $\mu\text{L}$ )を、SURECELL(商標)使い捨て試験装置(Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Inc.から入手可能;これは米国特許第4,948,561号明細書(Hincley他)に詳細に記載されている)中の試験ウエルの微孔質膜(LOPBDYNE(商標)ポリアミド膜、平均ポアサイズ $1.2\mu\text{m}$ 、Pall Corp.から)の限定領域に適用し乾燥させた。他の試薬と材料は、商業源から入手したか、または容易に入手可能な出発材料と常用手順を使って調製した。

【0063】実験:

プライマーの選択:本出願人らは、HIV-1の高度保存配列領域を特定することによりHIV-1およびHIV-2のためのPCR増幅システムの開発に着手した。次の基準を使って保存領域に対するプライマーをデザインした:(1)小さい生成物ほど高い効率で増幅し、有効ポリメラーゼ濃度、アニール/伸長時間または調製される試料の平均サイズの減少に対する感受性が低いので、生成物の長さは200ヌクレオチドを越えてはならない;(2)プライマーセットは増幅生成物の特異的検出のためにそれら間に機能的なクローブ領域を持たなければならない;(3)プライマーの3'末端付近の不正対合(ミスマッチ)は、5'末端付近の不正対合よりもはるかに好ましくない;(4)それらのプライマーは3'末端安定性、長さ、GC含量および別の可能なプライマーやプローブとの相互作用に関する確立されたプライマー開発基準を満たさなければならない。

【0064】初めに、次の1のプライマーを試験用に選択した:

GACGAGATCTGAGCTGGGAGCT、23マー(配列番号1)  
GACGAGATCTGAGCTGGGAGCTC、24マー(配列番号23)  
CTGCTTAAGCTCAATAAAGCTTCGCTTGA、31マー(配列番号24)  
CTGCTTAAGCTCAATAAAGCTTCGCTTGA、30マー(配列番号2)

GGTCTGAGGAGATCTCTAGTTACCAAGT、28マー(配列番号25)  
GGGCTGAGGAGATCTCTAGTTACCAAGT、29マー(配列番号3)  
GGGCTGAGGAGATCTCTAGTTACCAAGT、26マー(配列番号26)  
TGTGCGGGGCGCACTGCTAGAGA、23マー(配列番号4)  
TCGGGTTTATTACAGGACAGCAGAGA、27マー(配列番号7)  
GTATTACTACTGCGGCTTCACCTTTTCA、28マー(配列番号27)  
CTGTATTACTACTGCGGCTTCACCTTTTCA、31マー(配列番号8)

【0065】これらのプライマーの多くは、プライマーの5'末端、3'末端または両末端のこれらの配列を除いて別のプライマー1つまたは2つと同じである。配列番号1と23は、HIV-1ゲノムのLTR領域の1つの正プライマー領域であり、一方配列番号24と2は別のLTR正プライマー領域である。配列番号25、3および26は1つのLTR逆プライマー領域を表し、一方配列番号4は第二の領域を表す。配列番号7はHIV-1ゲノムのPOL領域に対してデザインした唯一の正プライマーであり、一方配列番号27と8は配列番号7と相補することができる逆プライマーである。

【0066】これらのプライマーを、PE9600サーモサイクラー上で40サイクルに渡るPCRによって反応液75  $\mu\text{L}$ あたりHIV-1標的0コピーまたは15コピーを増幅させ、次いでゲル電気泳動を使って検出することにより試験した。HIV-1標的DNAは次のようにして調製した。宿主染色体中に組み込まれたポリメラーゼ欠損HIVゲノムの単一コピーを含む8E5細胞(Folks T.M.他, J. Exp. Med. 164:280, 1986)を、10%ウシ胎児血清を含む90%RPMI培地中で増殖させた。典型的なSDS、プロテイナーゼK消化に続くフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって、 $2.5 \times 10^6$ 細胞/1 L培養物からDNAを調製した。得られた抽出物を塩化セシウム上でバンド沈降せしめ、透析し、抽出し、エタノール沈澱し、そして分析用に10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0)中に再懸濁した。 $A_{260}$ での光学濃度測定によりDNA含量を計算した。全ての反応は反応液75  $\mu\text{L}$ あたり3 mgの子牛胸腺DNAを添加すること以外は上述した通りに実施した。16通りの可能なLTR組合せと2通りの可能なPOL組合せの各々について複製反応を実施した。ゲル結果を第1表に示す。68°Cのアニール/伸長時間でのHIV-1標的を含まない対照反応は、配列番号23/4の組合せについて検出可能な副生成物バンドを示した。このため、この組合せはあまり好ましくないプライマーセットである。この副生成物の他には、いずれのアニール/伸長時間でも検出可能な副生成物は本質的に全く観察されなかった。

【0067】選ばれたプライマーを、2つのアニール/伸長時間においてゲルバンド強度の点から更に比較した。配列番号1または23を含む組合せ間にはゲルバンド強度にはほとんど差がなかった。配列番号24と2は、異な



I V-2プライマーをデザインする時に考慮した1つの追加の基準は、HIV-1とHIV-2の両方のプライマー候補との起こり得る相互作用を最小にすることであった。試験したHIV-2プライマーの最初のセットを下記に列挙する：

【0075】

CGGGGATAGTCGACGACAGCAACA (配列番号11)  
CGGGATAGTCGACGACAGCAACAG (配列番号28)  
CCCCAGAGCGTCAGTCGCAACA (配列番号29)  
CCGACGAGGTCACTGTCGCAACA (配列番号12)  
GGGAGGTTCTCTCCAGCACTAGCA (配列番号14)  
CCCTGGGAGGTTCTCTCCAGCA (配列番号30)  
GAGCCCTGGGAGGTTCTCTCCA (配列番号15)  
GGCACTAGGAGAGGTCGGAACACACA (配列番号16)  
CTGCTCGGGGCCCAACCTGCTA (配列番号31)  
CTGCACCTCAATTCTCTCTTTGGAAAGACAGTA (配列番号32)  
GACCTCAATTCTCTCTTTGGAAAGACAGTA (配列番号33)  
TAGACAGGGGCTGACGACACTCAATAGT (配列番号18)  
CACAGGGGCTGACGACACTCAATAGTAGCA (配列番号19)  
GCCAAAATGTTGATGGGGTATCTCTGTCTTA (配列番号20)  
GCCAAAATGTTGATGGGGTATCTCTGTCTTA (配列番号34)

【0076】HIV-2 DNAを調製するために、HIV-2のHut78 NIH-2株に感染した10ES細胞を、SDSおよびプロテイナーゼKで処理し、次いでフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈澱し、得られた抽出物を分析用に10 mM Tris/1 mM EDTA pH 8.0中に再懸濁した。

【0077】個々のHIV-2プライマーを、次の2つの異なる増幅プロフィール：

- (1) 68°Cのアニール/伸長温度で40サイクル；および
- (2) 62°Cのアニール/伸長温度で5サイクルに続いて68°Cのアニール/伸長温度で35サイクルを用いて、配列番号1、2、3、26、4、7および8のHIV-1プライマーと共に使った場合の副生成物を形成する能力についてスクリーニングした。二番目のプロフィールは、標的の不正対合の影響を最小にする条件下でのプライマーセットが副生成物形成を最小にできるかを決定する試験のために選んだ。条件1を使った時に配列番号7および8と共に強い副生成物を形成したどのプライマーも即座に捨てた。何故なら、それらのプライマーは同時増幅アッセイに最小にしかならないからである。この基準のために捨てたのは配列番号30および31のただ2つのプライマーであった。プライマーの残りを、様々な基準に基づいて集めていった。HIV-1プライマーと配列番号20により形成される副生成物が非常に低レベルであったために配列番号34よりも配列番号20を選んだ。配列番号11と12は副生成物をあまり生じず、更に確立された基準にも良く適合するために、配列番号28と29よりも配列番号11と12を選んだ。配列番号32と33は、増幅条件2の下で配列番号20または34のいずれかとは併用した時に比較的

貧弱な増幅であったために捨てた。残ったHIV-2プライマーセット(配列番号11/12、14/16、15/16、18/20および19/20)は全て、次のプライマー：配列番号2、3、7および8(各々0.4 μM)、IPC-F1(0.2 μM)およびIPC-R1(0.2 μM)を含む系において、反応あたり10コピーのHIV-2標的レベルで非常に良好に増幅させ且つ良く見えるゲルバンドを与える。上記の増幅条件1を使用した時のそれらの増幅システムによる副生成物形成はいずれも非常に少ない。増幅条件2を使用した時には有意な副生成物形成があるが、しかし特定の生成物がゲル上にまだ非常に良く検出可能である。

【0078】プローブ選択：HIV-1およびHIV-2のような多分岐のゲノムを扱う時には、2つのプライマーを使った各領域の増幅および1つのオリゴヌクレオチドプローブを使った各領域の検出を可能にするのに十分なほどに保存されている3つの領域を特定することはしばしば困難である。生成物の長さを最小にする必要があるシステムでは、プローブ特異性が損なわれ得る程度にまでプロービングの緊縮性を減らさない限り、この問題は作業を不可能にする程度にまで悪化する。この問題を避けるために、本出願人は、アッセイ特異性を傷つることなく、全ての既知配列変異体の検出を可能にするために多重プローブを使用するシステムを開発した。

【0079】配列番号2と3により形成される生成物を探索するために、プローブは長さがわずかに34ヌクレオチドの領域にはならなければならない。この領域中の最も保存された配列は配列番号5のプローブの配列である。プローブ：CAACAGCGGGCACACACTACT(配列番号5) この配列はHIV-1分離株の大部分に高度に保存されており、該プローブと分離株配列との領域と間には1個以下のヌクレオチドの相違しかない。しかしながら、この領域には2〜5個の変異を有する幾つかの分岐配列がある。将来それらの配列から更に分岐した配列を検出する能力を最大にするために、配列番号6の追加のプローブをデザインした。

プローブ：GAACAGATGGGCACACACTGCT(配列番号6)  
【0080】HIV-1 POLの場合、遭遇する変異の最大数および毒性性を最小にするように使用する両プローブを変えた。これを達成するために、デザインした両プローブはいずれの既知分離株配列とも等しくない。2つのプローブを使うことにより、任意の既知分離株に対して遭遇する変異の最大数を5から3に減らした。加えて、残りの変異の大部分はプローブの片側末端の付近に置かれ、かくしてハイブリダイゼーションした時のそれらの影響が小さくなる。HIV-1 POLプローブの配列を下記に示す：

AGCTTTGCTGCTCTTCCAAAGTGGG (配列番号9)

AGCTTTGCTGCTGCTCTTCCAAAGTGGG (配列番号10)

【0081】記載した上記状況は、2つのプローブを使用するHIV-2 POLシステム用に選ばれた配列に

についても同様である。しかしながら、この状況は、2つのプローブに相補的な領域は重複しているけれども位置が同一でないという点で幾らか異なっている。これは、HIV-2の2つの亜型間で配列が非常に異なるので必要な熱安定性を獲得するためにプローブの位置を変更しなればならないという事実のためである。この2つのプローブを使うと、全ての既知HIV-2配列は亜型特異的HIV-2プローブと比較して多くて2個のヌクレオチド相違を有する。2つのHIV-2 POLプローブ配列を下記に示す:

CCAAAAATAGTAGGGGGAATAGGGGATTC (配列番号21)

CACCCCAAAATAGTAGGGGATAGGAGG (配列番号22)

【0082】上述した同時増幅システムを、HIV-1およびHIV-2試料に対して試験した。比色検出に用いる検出プローブは下記のものであった:

HIV-1 LTR生成物:

CAACAGACGGGCACACACTACT (配列番号5)

GAAACAGATGGGCACACACTGCT (配列番号6)

HIV-1 POL生成物:

5'-AGCTTTGCTGCTCTTCCAAAGTGG (配列番号9)

5'-AGTTGTGCGGCTCTTCCAAATGGG (配列番号10)

【0083】HIV-2 POL生成物:

CCAAAAATAGTAGGGGGAATAGGGGATTC (配列番号21)

CACCCCAAAATAGTAGGGGATAGGAGG (配列番号22)

HIV-2 LTR生成物:

CCAGCTGCTGCTCTTAAGACTTC (配列番号17)

HIV-2 ENV生成物:

TGGACGTGCTCAGAGACACAGA (配列番号13)

【0084】始原型M群およびO群分離株を含む5種類の培養増幅したHIV-1分離株を試験した。試験した同時増幅システムは全て、配列番号7/8プライマーセット、内部陽性対照プライマーセット、並びに次の4つのHIV-1 LTRプライマーセットのうちの1つ: 配列番号1/3、1/4、2/3および2/4を含んだ。HIV-1特異的プライマーセットはいずれも試験した全ての分離株を検出した。標的DNAの系列希釈は、配列番号2/3および2/4プライマーセットが最も感受性のLTRプライマーセットであることを証明した。配列番号2/4プライマーセットは多量分のO群分離株に対して最も感受性であるように見えた。

【0085】2種類の培養増幅したHIV-2分離株も試験して様々なHIV-2プライマーセットの性能を評価した。どの反応も配列番号11/12プライマーセット、並びに次の4つのLTRまたはPOL特異的HIV-2プライマーセットのうちの1つ: 配列番号18/20、21/22、23/24、25/26、27/28、29/30、31/32、33/34、35/36、37/38、39/40、41/42、43/44、45/46、47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70、71/72、73/74、75/76、77/78、79/80、81/82、83/84、85/86、87/88、89/90、91/92、93/94、95/96、97/98、99/100、101/102、103/104、105/106、107/108、109/110、111/112、113/114、115/116、117/118、119/120、121/122、123/124、125/126、127/128、129/130、131/132、133/134、135/136、137/138、139/140、141/142、143/144、145/146、147/148、149/150、151/152、153/154、155/156、157/158、159/160、161/162、163/164、165/166、167/168、169/170、171/172、173/174、175/176、177/178、179/180、181/182、183/184、185/186、187/188、189/190、191/192、193/194、195/196、197/198、199/200、201/202、203/204、205/206、207/208、209/210、211/212、213/214、215/216、217/218、219/220、221/222、223/224、225/226、227/228、229/230、231/232、233/234、235/236、237/238、239/240、241/242、243/244、245/246、247/248、249/250、251/252、253/254、255/256、257/258、259/260、261/262、263/264、265/266、267/268、269/270、271/272、273/274、275/276、277/278、279/280、281/282、283/284、285/286、287/288、289/290、291/292、293/294、295/296、297/298、299/300、301/302、303/304、305/306、307/308、309/310、311/312、313/314、315/316、317/318、319/320、321/322、323/324、325/326、327/328、329/330、331/332、333/334、335/336、337/338、339/340、341/342、343/344、345/346、347/348、349/350、351/352、353/354、355/356、357/358、359/360、361/362、363/364、365/366、367/368、369/370、371/372、373/374、375/376、377/378、379/380、381/382、383/384、385/386、387/388、389/390、391/392、393/394、395/396、397/398、399/400、401/402、403/404、405/406、407/408、409/410、411/412、413/414、415/416、417/418、419/420、421/422、423/424、425/426、427/428、429/430、431/432、433/434、435/436、437/438、439/440、441/442、443/444、445/446、447/448、449/450、451/452、453/454、455/456、457/458、459/460、461/462、463/464、465/466、467/468、469/470、471/472、473/474、475/476、477/478、479/480、481/482、483/484、485/486、487/488、489/490、491/492、493/494、495/496、497/498、499/500、501/502、503/504、505/506、507/508、509/510、511/512、513/514、515/516、517/518、519/520、521/522、523/524、525/526、527/528、529/530、531/532、533/534、535/536、537/538、539/540、541/542、543/544、545/546、547/548、549/550、551/552、553/554、555/556、557/558、559/560、561/562、563/564、565/566、567/568、569/570、571/572、573/574、575/576、577/578、579/580、581/582、583/584、585/586、587/588、589/590、591/592、593/594、595/596、597/598、599/600、601/602、603/604、605/606、607/608、609/610、611/612、613/614、615/616、617/618、619/620、621/622、623/624、625/626、627/628、629/630、631/632、633/634、635/636、637/638、639/640、641/642、643/644、645/646、647/648、649/650、651/652、653/654、655/656、657/658、659/660、661/662、663/664、665/666、667/668、669/670、671/672、673/674、675/676、677/678、679/680、681/682、683/684、685/686、687/688、689/690、691/692、693/694、695/696、697/698、699/700、701/702、703/704、705/706、707/708、709/710、711/712、713/714、715/716、717/718、719/720、721/722、723/724、725/726、727/728、729/730、731/732、733/734、735/736、737/738、739/740、741/742、743/744、745/746、747/748、749/750、751/752、753/754、755/756、757/758、759/760、761/762、763/764、765/766、767/768、769/770、771/772、773/774、775/776、777/778、779/780、781/782、783/784、785/786、787/788、789/790、791/792、793/794、795/796、797/798、799/800、801/802、803/804、805/806、807/808、809/810、811/812、813/814、815/816、817/818、819/820、821/822、823/824、825/826、827/828、829/830、831/832、833/834、835/836、837/838、839/840、841/842、843/844、845/846、847/848、849/850、851/852、853/854、855/856、857/858、859/860、861/862、863/864、865/866、867/868、869/870、871/872、873/874、875/876、877/878、879/880、881/882、883/884、885/886、887/888、889/890、891/892、893/894、895/896、897/898、899/900、901/902、903/904、905/906、907/908、909/910、911/912、913/914、915/916、917/918、919/920、921/922、923/924、925/926、927/928、929/930、931/932、933/934、935/936、937/938、939/940、941/942、943/944、945/946、947/948、949/950、951/952、953/954、955/956、957/958、959/960、961/962、963/964、965/966、967/968、969/970、971/972、973/974、975/976、977/978、979/980、981/982、983/984、985/986、987/988、989/990、991/992、993/994、995/996、997/998、999/1000、1001/1002、1003/1004、1005/1006、1007/1008、1009/1010、1011/1012、1013/1014、1015/1016、1017/1018、1019/1020、1021/1022、1023/1024、1025/1026、1027/1028、1029/1030、1031/1032、1033/1034、1035/1036、1037/1038、1039/1040、1041/1042、1043/1044、1045/1046、1047/1048、1049/1050、1051/1052、1053/1054、1055/1056、1057/1058、1059/1060、1061/1062、1063/1064、1065/1066、1067/1068、1069/1070、1071/1072、1073/1074、1075/1076、1077/1078、1079/1080、1081/1082、1083/1084、1085/1086、1087/1088、1089/1090、1091/1092、1093/1094、1095/1096、1097/1098、1099/1100、1101/1102、1103/1104、1105/1106、1107/1108、1109/1110、1111/1112、1113/1114、1115/1116、1117/1118、1119/1120、1121/1122、1123/1124、1125/1126、1127/1128、1129/1130、1131/1132、1133/1134、1135/1136、1137/1138、1139/1140、1141/1142、1143/1144、1145/1146、1147/1148、1149/1150、1151/1152、1153/1154、1155/1156、1157/1158、1159/1160、1161/1162、1163/1164、1165/1166、1167/1168、1169/1170、1171/1172、1173/1174、1175/1176、1177/1178、1179/1180、1181/1182、1183/1184、1185/1186、1187/1188、1189/1190、1191/1192、1193/1194、1195/1196、1197/1198、1199/1200、1201/1202、1203/1204、1205/1206、1207/1208、1209/1210、1211/1212、1213/1214、1215/1216、1217/1218、1219/1220、1221/1222、1223/1224、1225/1226、1227/1228、1229/1230、1231/1232、1233/1234、1235/1236、1237/1238、1239/1240、1241/1242、1243/1244、1245/1246、1247/1248、1249/1250、1251/1252、1253/1254、1255/1256、1257/1258、1259/1260、1261/1262、1263/1264、1265/1266、1267/1268、1269/1270、1271/1272、1273/1274、1275/1276、1277/1278、1279/1280、1281/1282、1283/1284、1285/1286、1287/1288、1289/1290、1291/1292、1293/1294、1295/1296、1297/1298、1299/1300、1301/1302、1303/1304、1305/1306、1307/1308、1309/1310、1311/1312、1313/1314、1315/1316、1317/1318、1319/1320、1321/1322、1323/1324、1325/1326、1327/1328、1329/1330、1331/1332、1333/1334、1335/1336、1337/1338、1339/1340、1341/1342、1343/1344、1345/1346、1347/1348、1349/1350、1351/1352、1353/1354、1355/1356、1357/1358、1359/1360、1361/1362、1363/1364、1365/1366、1367/1368、1369/1370、1371/1372、1373/1374、1375/1376、1377/1378、1379/1380、1381/1382、1383/1384、1385/1386、1387/1388、1389/1390、1391/1392、1393/1394、1395/1396、1397/1398、1399/1400、1401/1402、1403/1404、1405/1406、1407/1408、1409/1410、1411/1412、1413/1414、1415/1416、1417/1418、1419/1420、1421/1422、1423/1424、1425/1426、1427/1428、1429/1430、1431/1432、1433/1434、1435/1436、1437/1438、1439/1440、1441/1442、1443/1444、1445/1446、1447/1448、1449/1450、1451/1452、1453/1454、1455/1456、1457/1458、1459/1460、1461/1462、1463/1464、1465/1466、1467/1468、1469/1470、1471/1472、1473/1474、1475/1476、1477/1478、1479/1480、1481/1482、1483/1484、1485/1486、1487/1488、1489/1490、1491/1492、1493/1494、1495/1496、1497/1498、1499/1500、1501/1502、1503/1504、1505/1506、1507/1508、1509/1510、1511/1512、1513/1514、1515/1516、1517/1518、1519/1520、1521/1522、1523/1524、1525/1526、1527/1528、1529/1530、1531/1532、1533/1534、1535/1536、1537/1538、1539/1540、1541/1542、1543/1544、1545/1546、1547/1548、1549/1550、1551/1552、1553/1554、1555/1556、1557/1558、1559/1560、1561/1562、1563/1564、1565/1566、1567/1568、1569/1570、1571/1572、1573/1574、1575/1576、1577/1578、1579/1580、1581/1582、1583/1584、1585/1586、1587/1588、1589/1590、1591/1592、1593/1594、1595/1596、1597/1598、1599/1600、1601/1602、1603/1604、1605/1606、1607/1608、1609/1610、1611/1612、1613/1614、1615/1616、1617/1618、1619/1620、1621/1622、1623/1624、1625/1626、1627/1628、1629/1630、1631/1632、1633/1634、1635/1636、1637/1638、1639/1640、1641/1642、1643/1644、1645/1646、1647/1648、1649/1650、1651/1652、1653/1654、1655/1656、1657/1658、1659/1660、1661/1662、1663/1664、1665/1666、1667/1668、1669/1670、1671/1672、1673/1674、1675/1676、1677/1678、1679/1680、1681/1682、1683/1684、1685/1686、1687/1688、1689/1690、1691/1692、1693/1694、1695/1696、1697/1698、1699/1700、1701/1702、1703/1704、1705/1706、1707/1708、1709/1710、1711/1712、1713/1714、1715/1716、1717/1718、1719/1720、1721/1722、1723/1724、1725/1726、1727/1728、1729/1730、1731/1732、1733/1734、1735/1736、1737/1738、1739/1740、1741/1742、1743/1744、1745/1746、1747/1748、1749/1750、1751/1752、1753/1754、1755/1756、1757/1758、1759/1760、1761/1762、1763/1764、1765/1766、1767/1768、1769/1770、1771/1772、1773/1774、1775/1776、1777/1778、1779/1780、1781/1782、1783/1784、1785/1786、1787/1788、1789/1790、1791/1792、1793/1794、1795/1796、1797/1798、1799/1800、1801/1802、1803/1804、1805/1806、1807/1808、1809/1810、1811/1812、1813/1814、1815/1816、1817/1818、1819/1820、1821/1822、1823/1824、1825/1826、1827/1828、1829/1830、1831/1832、1833/1834、1835/1836、1837/1838、1839/1840、1841/1842、1843/1844、1845/1846、1847/1848、1849/1850、1851/1852、1853/1854、1855/1856、1857/1858、1859/1860、1861/1862、1863/1864、1865/1866、1867/1868、1869/1870、1871/1872、1873/1874、1875/1876、1877/1878、1879/1880、1881/1882、1883/1884、1885/1886、1887/1888、1889/1890、1891/1892、1893/1894、1895/1896、1897/1898、1899/1900、1901/1902、1903/1904、1905/1906、1907/1908、1909/1910、1911/1912、1913/1914、1915/1916、1917/1918、1919/1920、1921/1922、1923/1924、1925/1926、1927/1928、1929/1930、1931/1932、1933/1934、1935/1936、1937/1938、1939/1940、1941/1942、1943/1944、1945/1946、1947/1948、1949/1950、1951/1952、1953/1954、1955/1956、1957/1958、1959/1960、1961/1962、1963/1964、1965/1966、1967/1968、1969/1970、1971/1972、1973/1974、1975/1976、1977/1978、1979/1980、1981/1982、1983/1984、1985/1986、1987/1988、1989/1990、1991/1992、1993/1994、1995/1996、1997/1998、1999/2000、2001/2002、2003/2004、2005/2006、2007/2008、2009/2010、2011/2012、2013/2014、2015/2016、2017/2018、2019/2020、2021/2022、2023/2024、2025/2026、2027/2028、2029/2030、2031/2032、2033/2034、2035/2036、2037/2038、2039/2040、2041/2042、2043/2044、2045/2046、2047/2048、2049/2050、2051/2052、2053/2054、2055/2056、2057/2058、2059/2060、2061/2062、2063/2064、2065/2066、2067/2068、2069/2070、2071/2072、2073/2074、2075/2076、2077/2078、2079/2080、2081/2082、2083/2084、2085/2086、2087/2088、2089/2090、2091/2092、2093/2094、2095/2096、2097/2098、2099/2100、2101/2102、2103/2104、2105/2106、2107/2108、2109/2110、2111/2112、2113/2114、2115/2116、2117/2118、2119/2120、2121/2122、2123/2124、2125/2126、2127/2128、2129/2130、2131/2132、2133/2134、2135/2136、2137/2138、2139/2140、2141/2142、2143/2144、2145/2146、2147/2148、2149/2150、2151/2152、2153/2154、2155/2156、2157/2158、2159/2160、2161/2162、2163/2164、2165/2166、2167/2168、2169/2170、2171/2172、2173/2174、2175/2176、2177/2178、2179/2180、2181/2182、2183/2184、2185/2186、2187/2188、2189/2190、2191/2192、2193/2194、2195/2196、2197/2198、2199/2200、2201/2202、2203/2204、2205/2206、2207/2208、2209/2210、2211/2212、2213/2214、2215/2216、2217/2218、2219/2220、2221/2222、2223/2224、2225/2226、2227/2228、2229/2230、2231/2232、2233/2234、2235/2236、2237/2238、2239/2240、2241/2242、2243/2244、2245/2246、2247/2248、2249/2250、2251/2252、2253/2254、2255/2256、2257/2258、2259/2260、2261/2262、2263/2264、2265/2266、2267/2268、2269/2270、2271/2272、2273/2274、2275/2276、2277/2278、2279/2280、2281/2282、2283/2284、2285/2286、2287/2288、2289/2290、2291/2292、2293/2294、2295/2296、2297/2298、2299/2300、2301/2302、2303/2304、2305/2306、2307/2308、2309/2310、2311/2312、2313/2314、2315/2316、2317/2318、2319/2320、2321/2322、2323/2324、2325/2326、2327/2328、2329/2330、2331/2332、2333/2334、2335/2336、2337/2338、2339/2340、2341/2342、2343/2344、2345/2346、2347/2348、2349/2350、2351/2352、2353/2354、2355/2356、2357/2358、2359/2360、2361/2362、2363/2364、2365/2366、2367/2368、2369/2370、2371/2372、2373/2374、2375/2376、2377/2378、2379/2380、2381/2382、2383/2384、2385/2386、2387/2388、2389/2390、2391/2392、2393/2394、2395/2396、2397/2398、2399/2400、2401/2402、2403/2404、2405/2406、2407/2408、2409/2410、2411/2412、2413/2414、2415/2416、2417/2418、2

配列： CTGCTTAAGC CTCATAAAG CTGCGCTTGA	30
【0090】配列番号：3 配列の長さ：29 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： GGGTCGAGG GATCTCTAGT TACCAGAGT	29
【0091】配列番号：4 配列の長さ：23 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： TGTTCGGCGG CCACTGCTAG AGA	23
【0092】配列番号：5 配列の長さ：22 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： CAACAGACGG GCACACACTA CT	22
【0093】配列番号：6 配列の長さ：22 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： GAACAGATGG GCACACACTG CT	22
【0094】配列番号：7 配列の長さ：27 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： TCGGGTTTAT TACAGGGACA GCAGAGA	27
【0095】配列番号：8 配列の長さ：31 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： CTGTATTAC TACTGCCCT TCACCTTTCC A	31
【0096】配列番号：9 配列の長さ：27 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： AGCTTTGCTG GTCTTTCCA AAGTGGG	27
【0097】配列番号：10 配列の長さ：27 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： AGTTGTGCGG GTCTTTCCA AATTGGG	27
【0098】配列番号：11 配列の長さ：25 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA
配列： COGGGATAGT GCAGCAACAG CAACA	25
【0099】配列番号：12 配列の長さ：21 配列の型：核酸	鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 配列の種類：Genomic DNA



配列: CCCAGAGGGT CAGTCGCAAC A	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	21
【0100】配列番号: 13 配列の長さ: 26 配列の型: 核酸		
配列: TGGACGTGGT CAGAGACAA CAGAA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	26
【0101】配列番号: 14 配列の長さ: 24 配列の型: 核酸		
配列: GGGAGTTCT CTCCAGCACT AGCA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	24
【0102】配列番号: 15 配列の長さ: 22 配列の型: 核酸		
配列: GAGCCCTGGG AGGTTCTCTC CA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	22
【0103】配列番号: 16 配列の長さ: 26 配列の型: 核酸		
配列: GGGACTAGGA GAGATGGAA CACACA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	26
【0104】配列番号: 17 配列の長さ: 25 配列の型: 核酸		
配列: CCACGCTTGC TTGCTTAAG ACCTC	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	25
【0105】配列番号: 18 配列の長さ: 28 配列の型: 核酸		
配列: TAGACACAGG GGCTGACGAC TCAATAGT	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	28
【0106】配列番号: 19 配列の長さ: 28 配列の型: 核酸		
配列: CACAGGGGCT GAGGACTCAA TAGTAGCA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	28
【0107】配列番号: 20 配列の長さ: 35 配列の型: 核酸		
配列: GCCAAAATG TTGATTGGGG TATCTCTGT CATTA	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	35
【0108】配列番号: 21 配列の長さ: 30 配列の型: 核酸		
配列: CCAAAATAG TAGGGGAAT AGGGGATTC	鎖の数: 一本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA	30
【0109】配列番号: 22 配列の長さ: 31 配列の型: 核酸		

配列： CACCCAAAA ATAGTAGGTG GGATAGGAGG G	31
【0110】配列番号：23	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：24	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： GACCAGATCT GAGCTGGGA GCTC	24
【0111】配列番号：24	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：31	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： CTGCTTAAGC CTCATAANG CTTCCTTGA G	31
【0112】配列番号：25	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：28	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： GGTCTGAGGG ATCTCTAGTT ACCAGAGT	28
【0113】配列番号：26	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：26	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： GGGTCGAGG GATCTCTAGT TACCAG	26
【0114】配列番号：27	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：28	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： GTATTACTAC TGCCCTTCA CCTTCCA	28
【0115】配列番号：28	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：25	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： CGGGATAGTG CAGCAACAGC AACAG	25
【0116】配列番号：29	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：22	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： CCCCAGACGG TCAGTCGCA CA	22
【0117】配列番号：30	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：22	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： CCTGGGAGG TTCTCTCCAG CA	22
【0118】配列番号：31	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：22	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
配列： CTGTTGGGC GCCAACCTGC TA	22
【0119】配列番号：32	鎖の数：一本鎖
配列の長さ：35	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA

配列:	CTGCACCTCA ATTCTCTCTT TGGAAAAGAC CAGTA	35
【0120】配列番号:33	鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:33	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	配列の種類:Genomic DNA	
配列:	GCACCTCAAT TCTCTCTTG GAAAGACCA GTA	33
【0121】配列番号:34	鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:32	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	配列の種類:Genomic DNA	
配列:	GCCAAAATG TTGATTGGGG TATCTCTGT CA	32

## フロントページの続き

(72)発明者 スーザン メリッサ アトゥッド  
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 14620,  
 ロチェスター, ランスデイル ストリート  
 47  
 (72)発明者 アン エリザベス ケイジー  
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 14617,  
 ロチェスター, ウィノナ プールバード  
 399

(72)発明者 エリック ブライス ラズムッセン  
 アメリカ合衆国, ウィスコンシン 53719,  
 マディソン, アパートメント 309, ティ  
 ンバーレイク トレイル 7329  
 (72)発明者 トマス ジョセフ カミンズ  
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 14526,  
 ベンフィールド, ヘンダーソン ドライブ  
 83